

Antikörpertiter bei B16-Mäuse-Melanomen

Ein tierexperimentelles Modell
zum Nachweis tumorassoziierter humoraler
Antikörper bei menschlichen malignen
Melanomen

Ilka Schimming

Diss.
München
1985



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Dermatologischen Klinik und Poliklinik
der Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. O. Braun-Falco

Antikörpertiter bei B16-Mäuse-Melanomen
Ein tierexperimentelles Modell
zum Nachweis tumorassoziierter humoraler Antikörper
bei menschlichen malignen Melanomen

Inaugural-Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Ilka Schimming

aus

München

Jahr

1984

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität
München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. B.-R. Balda

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. h.c. O. Braun-Falco

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 26. März 1985

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	4
2. MATERIAL UND METHODEN	11
2.1 B16-Melanom	11
2.2. Tiere	11
2.2.1. Mäuse	11
2.2.2. Kaninchen	11
2.3 Seren	11
2.3.1. Spezifität der Seren	11
2.3.1.1. Normalseren	11
2.3.1.2. Spezifische Antiseren	12
2.3.1.3. Seren von Tumorträgern	12
2.3.1.4. Seren von Tumor exzidierten Mäusen	13
2.3.1.5. Seren von Mäusen mit verzögert aufgetretenem Tumor	13
2.3.2. Lagerung der Seren	13
2.3.3. Absorption der Seren	14
2.3.3.1. In vitro-Absorption	14
2.3.3.2. In vivo-Absorption	14
2.4. Immunfluoreszenztechnik	15

	Seite
2.5	^3H -Thymidin-Einbauhemmtest 17
2.5.1.	Zellkultur 17
2.5.2.	Markierung mit ^3H -Thymidin 17
2.5.3.	Ernten der Zellen und Zählen der eingebauten ^3H -Thymidin-Aktivität 18
3.	ERGEBNISSE 19
3.1	Immunfluoreszenz 19
3.1.1.	Normalseren 20
3.1.2.	Spezifische Antiseren 20
3.1.2.1.	Anti-B16-Kaninchen-Serum 20
3.1.2.1.1.	nach in vitro-Absorption 21
3.1.2.1.2.	nach in vivo-Absorption 21
3.1.2.2.	Anti-B16-Maus-Serum 21
3.1.2.3.	Anti-Maushaut-Kaninchen-Serum 23
3.1.2.3.1.	nach in vitro-Absorption 23
3.1.2.3.2.	nach in vivo-Absorption 23
3.1.2.4.	Kontrollen 23
3.1.3.	Seren von Tumorträgern 25
3.1.4.	Seren von Mäusen mit verzögert aufgetretenem Tumor 25
3.1.5.	Seren von Tumor exzidierten Mäusen 27

	Seite
3.2.	^3H -Thymidin-Einbauhemmtest 29
3.2.1.	Spezifische Antiseren 31
3.2.1.1.	Anti-B16-Kaninchen-Serum 31
3.2.1.1.1.	nach in vitro-Absorption 31
3.2.1.1.2.	nach in vivo-Absorption 31
3.2.1.2.	Anti-B16-Maus-Serum 31
3.2.1.3.	Anti-Maushaut-Kaninchen-Serum 34
3.2.2.	Seren von Tumorträgern 36
3.2.3.	Seren von Mäusen mit verzögert aufgetretenem Tumor 36
3.2.4.	Seren von Tumor exzidierten Mäusen 38
4.	DISKUSSION 40
5.	BEGRIFFSERLÄUTERUNGEN 48
6.	ZUSAMMENFASSUNG 49
7.	LITERATURVERZEICHNIS 50

1. EINLEITUNG

Immunreaktionen des menschlichen oder tierischen Organismus können sich unter bestimmten Bedingungen gegen Organe, Gewebe, Zellen oder Zellbestandteile richten. Diese Bedingungen liegen beispielsweise vor, wenn Organe von xenogenen oder allogenen Spendern stammen, das Transplantat vom Empfänger als "fremd" erkannt und abgestoßen wird.

Eine andere Möglichkeit zur Auslösung einer Immunreaktion ergibt sich, wenn körpereigene Zellen neue antigene Eigenschaften erworben haben. So sprechen viele Befunde dafür, daß sich neue Antigene oder Antigendeterminanten bei der malignen Transformation einer Zelle bilden und neben den normalen Histokompatibilitätsantigenen, z.B. an den Oberflächenmembranen tierischer oder menschlicher Zellen, nachweisbar werden.

Neue Antigenmuster können sich jedoch auch durch ein Wiederauftauchen eines embryonalen Antigens oder durch den Verlust eines Antigens ergeben (41).

Zumindest in jedem entsprechend untersuchtem tierischen malignen Tumor finden sich krebsspezifische Antigene (10, 43), weshalb die Bemühungen dahin gehen, die gleiche Aussage auch für die menschlichen Neoplasien machen zu können.

Bei vielen Krebsarten lassen sich bereits beim Menschen sog. TSTA (tumor specific transplantation antigens), das sind membrangebundene Antigene, die eine erfolgreiche Immunantwort des Wirts auslösen können, in vitro nachweisen (49), so z.B. bei Leukosen, Lymphomen, Sarkomen, Melanomen, intestinalen Karzinomen, Harnblasenkarzinomen, Hypernephromen (1, 26, 27, 46).

Anfangs wurden die meisten der krebsspezifischen Antigene durch ihre Fähigkeit dargestellt, tumorspezifische Transplantationsresistenz zu erzeugen, indem das Angehen eines Transplantattumors bei einem genetisch kompatiblen Tier durch Vorimmunisierung mit devitalisierten oder einer hinsichtlich des Angehens unterschwelligen Zellzahl des gleichen Tumors verhindert wurde.

Die nächsten Schritte waren die Entwicklung von in-vitro- und in-vivo-Techniken, um die einzelnen Komponenten der Immunantwort, zellvermittelte und humorale, nachzuweisen. Durch die in-vitro-Tests gelang es auch beim Menschen Antikörper gegen Tumorzellen sowie Lymphozyten mit zytotoxischer Aktivität darzustellen, die nach Kontakt mit malignen Zellen diese töten, während normale Zellen vital bleiben.

Es bleibt die Frage, warum maligne Tumoren dennoch progressiv und infiltrativ wachsen.

Offensichtlich sind Entwicklung und Wachstum maligner Tumoren das Ergebnis einer biologischen Wechselwirkung zwischen Tumorzellen und mehreren Kontroll- bzw. Abwehrsystemen des betroffenen Organismus. Ein bösartiger Tumor kann nur entstehen und weiterwachsen, wenn diese Kontroll- und Abwehrsysteme defekt oder geschwächt sind oder aus anderen Gründen versagen.

Dem Immunsystem wird dabei die Hauptrolle zugeschrieben ("immunologic surveillance"), denn durch eine Verschlechterung der Immunantwort, wie z.B. durch neonatale Thymektomie, Röntgenbestrahlung, Chemotherapie oder die Gabe von Antilymphozytenserum, wird die Inzidenz spontaner und die Angehrate transplantiert Tumoren heraufgesetzt (14, 46, 49). Als Beispiel gelten Patienten nach Nierentransplantation, die immunsuppressiv behandelt werden und bei denen gehäuft maligne Tumoren auftreten (50, 46).

Zwar wird höchstwahrscheinlich der eigentliche Vorgang der malignen Transformation immunologisch nicht beeinflusst (1), sondern erst die vorhandene bösartige Zelle kann immunologische Vorgänge initiieren, den Organismus sensibilisieren und dieser eliminiert dann die "fremde" Zelle.

Trifft diese Transformation jedoch auf eine, wodurch auch immer entstandene, "ungünstige" immunologische Situation, so könnte die Sensibilisierung verzögert oder herabgesetzt sein und ein Anwachsen maligner Zellen zum Tumor resultieren, bevor die Abwehr in Gang kommt.

Hat ein solcher Tumor erst einmal eine bestimmte Größe (nach Nagel (48) 0,01-0,1 g entsprechend 10^7 - 10^8 Tumorzellen) überschritten, so ist meist das Weiterwachsen nicht mehr aufzuhalten (42, 48, 65).

Einschränkend ist jedoch festzustellen, daß die Reaktion des Empfängerorganismus bei der Transplantation allogenen oder xenogenen Gewebes mit einer Masse von mehr als 0,1 g mit der Reaktion im Körper eines Tumorträgers im Prinzip vergleichbar ist, d.h. der Körper reagiert jeweils sowohl mit einer zellvermittelten als auch mit einer aus humoralen Antikörpern bestehenden Abwehr.

Beides sind also Reaktionen gegen Gewebe, die als "fremd" erkannt werden. Der Unterschied besteht allerdings darin, daß das transplantierte Gewebe abgestoßen wird, der maligne Tumor aber persistiert und trotz vorhandener Immunreaktion weiterwächst.

Eine Erklärung könnte die schon des öfteren postulierte relativ schwache Antigenität der TSTA und der dazugehörigen Immunreaktionen im Vergleich zu der starken der Histokompatibilitätsantigene sein, aber eine letztlich schlüssige Antwort scheint derzeit noch nicht möglich zu sein.

Maligne Melanome wurden und werden sehr häufig auf ihre Fähigkeit untersucht, Immunreaktionen auszulösen, da sie innerhalb der menschlichen Tumoren eine gewisse Sonderstellung einnehmen, als bestimmte biologische Eigenschaften der Melanome per se auf immunologische Reaktionen des betroffenen Organismus schließen lassen.

So wird gelegentlich behauptet, daß Melanome die Tumoren mit der höchsten Rate an Spontanremissionen seien. Die örtliche Aggressivität des Primärtumors ist relativ unbedeutend. Bestimmend für den malignen Verlauf ist oft die sehr früh einsetzende Metastasierung, zumindest in die regionalen Lymphknoten in Form von Mikrometastasen, die meist nicht nachzuweisen ist, aber in 50% der Fälle bei Diagnosestellung angenommen werden muß (71).

Typisch ist auch die Unvorhersehbarkeit des Krankheitsverlaufs. Bei einigen Patienten mit nachgewiesenen, disseminierten Metastasen können einige Metastasen verschwinden, während gleichzeitig an anderer Stelle desselben Organismus andere sich vergrößern oder neue entstehen (36, 55). Oft besteht über lange Zeit ein "Gleichgewicht" zwischen Patient und dessen Tumor und die bei sonstigen Malignomen gleicher Größe und Verteilung zu beobachtende Tumoranämie, -dysproteinämie und -kachexie ist nicht festzustellen bis zu einem meist kurzen, präfinalen Stadium, das durch den Zusammenbruch der Abwehrleistungen des Patienten gekennzeichnet ist (5, 55, 69, 70).

In Einzelfällen ist es gelungen, bei Kranken, die Empfänger einer Bluttransfusion von einem Patienten mit einer Spontanremission eines Melanoms waren, eine Remission ihres bereits disseminierten Melanoms auf Zeit oder vollständig zu erreichen (45, 55, 62, 63).

Durch zahlreiche Untersuchungen konnte bisher bewiesen werden, daß tumorspezifische Melanomantigene existieren auf Grund des Nachweises korrespondierender Antikörper und spezifisch gegen den Tumor gerichteter Zellreaktionen.

Nach Meinung vieler Autoren spielt bei der Tumorabwehr und speziell bei der Abwehr maligner Melanome als besonderes Beispiel solider Tumoren die zellvermittelte Abwehr die größte Rolle (22, 23, 41).

Hellström et al. (22) konnten in vitro die Zytotoxizität der Lymphozyten in allen klinischen Stadien (I-III) maligner Melanome durch Kolonieninhibitionstests nachweisen, darüber hinaus Nagel (49) mit einer gemischten Lymphozyten-Tumor-Zellkultur, De Vries (66) mit einem Mikrozytotoxizitätstest.

Hellström (21, 23), Sjörgren (59) und andere sehen in den humoralen Antikörpern vor allem ihre antagonistische Wirkung in Form blockierender Antikörper oder als blockierende Antigen-Antikörperkomplexe.

Humorale Antikörper wurden mit verschiedenen Tests nachgewiesen, wie z.B. Immunfluoreszenz (16, 36, 43, 47, 51, 53, 55), Komplementfixation (45), komplementabhängige Zytotoxizität (4, 8, 36), gemischte Agglutination, Immunadhärenz (12), Double Antibody-Radioimmun-Assay (6), komplementabhängige Hemmung der Ribonukleinsäuresynthese (36) etc.

Vielleicht liegt es an der Vielzahl der Tests, den unterschiedlichen Techniken und den verschiedenen Wirkungsweisen, in denen die Antikörper jeweils erfaßt werden, daß die bisher veröffentlichten Ergebnisse zum Teil widersprüchlich sind.

Trotz allem scheint sich abzuzeichnen, daß die Antikörpertiter während des Verlaufs und des Fortschreitens der Melanom-Krankheit einer Veränderung unterliegen und daß auch Behandlung und Behandlungsart einen Einfluß auf die Höhe der Antikörpertiter haben können.

So wäre es denkbar die einzelnen Stadien maligner Melanome an Hand von Antikörpertiterverläufen zu verfolgen und ein Fortschreiten der Erkrankung evtl. schon vor dem klinischen in Erscheinung treten festzustellen, um dann einer drohenden Aussaat maligner Melanomzellen mit geeigneten Mitteln entgegenzutreten, da ja gerade bei malignen Melanomen wegen des guten Allgemeinbefindens des Patienten die Metastasierung oft übersehen oder zu spät bemerkt wird.

Um diesem Ziel näher zu kommen, Krankheitsverläufe routinemäßig mit Hilfe von Antikörpertitern verfolgen zu können, bedarf es einfacher Methoden, um im Tierversuch und dann an menschlichen Seren Aussagen über das Tumorstadium und die jeweilige Immunsituation machen zu können.

In dieser Arbeit wurde der Versuch unternommen an Hand von Tierversuchen mit C57 Bl-Mäusen und dem B 16-Melanom, einem Transplantattumor, der einst spontan in einer C57 Bl-Maus entstanden war, die Antikörpertiterverläufe während des Wachstums des Tumors, darzustellen. Außerdem wurden die Antikörper nach Exzision der angewachsenen Melanome beobachtet.

Mit dem Serum eines mit B 16-Melanomzellen immunisierten Kaninchens wurden Absorptionsstudien betrieben mit dem Ziel, B 16-Melanom-spezifische Antikörper, und damit die entsprechenden Antigene, nachzuweisen.

Alle Untersuchungen wurden sowohl mit indirekter Immunfluoreszenz als auch mit einem ^3H -Thymidineinbauhemmtest durchgeführt und miteinander verglichen, um festzustellen, ob sich diese Tests für Routineuntersuchungen eignen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 B16-Melanom

Das B16-Melanom entstand 1954 spontan in einer C57 Bl-Maus im Jackson-Laboratory (Handbook on Genetically Standardized Jax Mice, 19).

Es wird seitdem weiblichen C57 Bl-Mäusen subcutan weitertransplantiert (jeweils etwa 10^6 Tumorzellen in einem kleinen Gewebestück). 2-3 Wochen nach Transplantation ist der Tumor etwa zu Kirschkergröße herangewachsen und wird entweder für Versuche verwendet oder auf andere C57 Bl-Mäuse weitertransplantiert.

2.2 Tiere

2.2.1. Mäuse

Es wurden in allen Versuchen 6-8 Wochen alte, ingezüchtete C57 Bl-Mäuse verwendet.

2.2.2. Kaninchen

Es wurden normale Stallkaninchen verwendet.

2.3 Seren

2.3.1. Spezifität der Seren

2.3.1.1. Normalseren

6-8 Wochen alte C57 Bl-Mäuse (bzw. normale Kaninchen) wurden entblutet und das Serum durch Abzentrifugieren gewonnen.

2.3.1.2. Spezifische Antiseren

B16-Melanom-Tumor wurde von der Maus möglichst steril exzidiert, grob mit der Schere zerkleinert, in 30 ml angereicherte PBS-Lösung gegeben und 20 min im Homogenisator zerkleinert. Die entstandene Zellsuspension wurde zentrifugiert (10 min, 1000 rpm).

Die Zellen wurden in PBS aufgelöst und auf eine Konzentration von 10^7 lebende Tumorzellen/ml eingestellt (die Zellzahl wurde in einer Zählkammer unter dem Mikroskop nach Anfärben mit Eosin bestimmt) und anschließend mit 40 gy (Kobalt 60) bestrahlt.

1 ml (= 10^7 Zellen) der bestrahlten Zellsuspension (die Zellen sind somit nicht mehr teilungsfähig) wurde einem Kaninchen und je 0,1 ml (= 10^6 Zellen) 10 C57 Bl-Mäusen subcutan injiziert und zwar 5 mal in wöchentlichem Abstand. Beim 5. Mal wurde zusätzlich Freundsches Ajuvans s.c. injiziert und zwar 1 ml dem Kaninchen und je 0,1 ml den Mäusen.

Eine Woche nach der letzten Injektion wurden die Tiere entblutet, das Serum durch Zentrifugieren gewonnen, die Mäuseseren gepoolt und in kleinen Portionen eingefroren.

Das gleiche Verfahren wurde mit normaler Maushaut einer C57 Bl-Maus an Stelle des B16-Tumors durchgeführt und damit ein spezifisches Antiserum gegen Maushaut hergestellt (ebenfalls in Kaninchen und in C57 Bl-Mäusen).

2.3.1.3. Seren von Tumorträgern

C57 Bl-Mäuse bekamen in gewohnter Weise ein B16-Melanom transplantiert. Dann wurden in 3tägigem Abstand bis zum 21. Tag post transplantationem jeweils 4 Tiere entblutet; die Seren der 4 Mäuse wurden gepoolt und portionsweise eingefroren.

2.3.1.4 Seren von Tumor exidierten Mäusen

C57 Bl-Mäuse wurden wie üblich mit B16-Melanom subcutan beimpft. Nach 2-3 Wochen, als der Tumor etwa kirschkerngroß war, wurde den Tieren nach Evipanmedikation der Tumor operativ entfernt, was die Tiere sehr gut vertrugen. Danach wurden sie wieder zu je 4 Tieren alle 5 Tage bis zum 20. Tag entblutet. Diesmal wurden die Seren jedoch nicht gepoolt, sondern es wurde von jedem Tier einzeln das Serum portionsweise eingefroren.

2.3.1.5. Seren von Mäusen mit verzögert aufgetretenem Tumor

Bei 2 Mäusen schien es, als ob der transplantierte Tumor nicht angehen würde. Als dann am 56. Tag post transplantationem doch noch ein Tumor erschien, wurden die Mäuse entblutet und die Seren ebenfalls portionsweise eingefroren.

2.3.2. Lagerung der Seren

Alle Seren wurden (die Mäuseseren bereits 1:5 verdünnt) in 0,5 ml Portionen in kleinen Glasfläschen eingefroren und bei -20°C gelagert.

Die Seren wurden portionsweise eingefroren, um ein mehrfaches Auftauen und Wiedereingefrieren zu vermeiden, was eventuell die Aktivität der Seren vermindert oder zumindest verändert hätte.

2.3.3. Absorption der Seren

2.3.3.1. In vitro-Absorption (modifiziert nach Fritze 17, 18)

1 ml des zu absorbierenden Serums wurde mit 1 g zerkleinertem Frischgewebe (entweder B16-Melanom oder Leber einer normalen C57 Bl-Maus) vermischt und etwa 20 Stunden in ein 37°C Warmwasser-Schüttelbad gestellt.

Dann wurde das Serum abzentrifugiert und zwar 10 min bei 1000 rpm, der Überstand 10 min bei 3000 rpm und nochmals der Überstand 10 min bei 10000 rpm. Der Überstand (= absorbiertes Serum) wurde wieder portionsweise eingefroren.

2.3.3.2. In vivo-Absorption (nach Hilgers 32)

Normalen C57 B1-Mäusen wurde je 1 ml unverdünntes Anti-B16-Serum vom Kaninchen bzw. Anti-Maushaut-Serum vom Kaninchen intraperitoneal injiziert. Nach 24 Stunden wurden die Mäuse entblutet, die entsprechenden Seren gepoolt und portionsweise eingefroren.

2.4. Immunfluoreszenztechnik

Ein Block frisch exzidiertes Tumorgewebe von etwa 5 mm Kantenlänge wurde mit flüssigem Stickstoff schnell tiefgefroren und dann bei -20°C mit einem Kryostat in $4\text{ }\mu$ dicke Schnitte geschnitten.

Die Schnitte wurden auf Objektträger gegeben und an der Luft getrocknet. Dabei handelte es sich um Spezialobjektträger (von Cooke) mit 8 Aufteilungen, so daß dann später auf einem Objektträger jeweils die verschiedenen Verdünnungen eines Serums mit positiver und negativer Kontrolle betrachtet und somit leichter beurteilt werden konnten.

Die Kryostat-Schnitte wurden jeweils frisch vor der Durchführung eines Immunfluoreszenztests hergestellt.

Der Versuch, statt der Kryostat-Schnitte Imprints oder Abklatschpräparate des Tumors herzunehmen, schlug fehl, da sich beim Aufdrücken des Tumorgewebes auf den Objektträger hauptsächlich abgestorbene, nekrotische Zellen lösten und sich somit falsch-positive Ergebnisse ergaben, da tote Zellen viel mehr unspezifische Immunfluoreszenz binden.

Die Objektträger mit den Kryostat-Schnitten wurden in eine feuchte Kammer gelegt. Dann wurde pro Feld ein Tropfen Serum in der entsprechenden Verdünnung (1:40 bis 1:1280) aufgetragen, ebenso als negative bzw. positive Kontrolle Normalserum 1:40 bzw. Anti-B16-Kaninchenserum 1:160.

Nach einer Inkubationszeit von 30 min wurde das Serum mit PBS ($\text{pH}=7,2$) abgespült und dann die Objektträger für 30 min in PBS gestellt, wobei die Waschlösung alle 10 min erneuert und zwischendurch mehrfach das Behältnis geschwenkt wurde, um den Spüleffekt zu verbessern.

Darauf kamen die Objektträger zurück in die feuchte Kammer, und es wurde mit Fluorescein markiertes Anti-Mausglobulin-Serum vom Kaninchen (bzw. mit Fluorescein markiertes Anti-Kaninchenglobulin-Serum von der Ziege) aufgetragen und wiederum 30 min inkubiert.

Es folgte der gleiche Waschvorgang wie nach der ersten Inkubation, anschließend ein kurzes Eintauchen in Aqua dest.

Die Objektträger wurden mit dem Fön getrocknet, mit einem Glyzerinpuffer (pH=7,2) beschichtet und mit einem Deckgläschen abgedeckt.

Nach einer Ruhezeit von mindestens 15 min konnten die Schnitte unter einem Immunfluoreszenzmikroskop betrachtet und beurteilt werden.

Zur Aufbewahrung wurden die fertigen Objektträger bei -20°C eingefroren und konnten so noch nach einigen Wochen betrachtet werden, ohne allzuviel von ihrer Farbintensität eingebüßt zu haben.

2.5. ^3H -Thymidin-Einbauhemmtest (modifiziert nach Cleveland 9)

2.5.1. Zellkultur

Der Tumor (B16-Melanom) wurde möglichst steril von der Maus entnommen, in sterile PBS gegeben und mit einer Schere zerkleinert. Nach dreimaliger Spülung mit PBS wurde 0,25%ige Trypsin-Versen-Lösung daraufgegeben und auf einem Magnetrührer 30 min gerührt. Die Suspension wurde durch einen 4fachen Mullfilter gegossen (durch den nur Einzelzellen durchgehen) und anschließend 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert.

Nach dem Abgießen des Überstandes wurde der Bodensatz (=Einzelzellen des Tumors) mit Medium (bestehend aus RPMI 1640 - Zellkulturmedium + 30% fötalem Kälberserum + Gentamycin) gelöst, auf etwa 5×10^5 bis 1×10^6 Zellen/ml eingestellt, in Falcon-Brutflaschen gefüllt und 24 Std. in den Brutschrank (37°C) gestellt.

2.5.2. Markierung mit ^3H -Thymidin

Am nächsten Tag wurden jeweils in 3 Vertiefungen von Mikrotest-II-Platten 40 μl des zu testenden Serums bzw. Normalserum in der entsprechend gewünschten Verdünnung gegeben. Die Zellkulturen vom Vortag wurden abtrypsinisiert (mit 25%iger Trypsin-Versen-Lösung), durch Auszählen in der Zählkammer auf eine Konzentration von $2,5 \times 10^4$ Zellen/ml mit Medium (= RPMI 1640 - Zellkulturmedium + 30% fötales Kälberserum + Gentamycin) eingestellt und von dieser Zellsuspension ebenso 40 μl pro Vertiefung gegeben (= 1000 Zellen/Loch).

Das Ganze wurde auf einem Mikrotiterplatten-Schüttelgerät gemixt und 15 min im Brutschrank (37°C) inkubiert.

Das Nächste war die Zugabe von je 40 µl Kaninchen-Komplement (1:25 verdünnt), erneutes Durchschütteln und Inkubation von 60 min im Brutschrank.

Medium (= RPMI 1640 + 30% fötales Kälberserum + Gentamycin) wurde mit ^3H -Thymidin versetzt und auf eine Konzentration von 14 µCi ^3H -Thymidin/ml eingestellt.

Von diesem Gemisch wurden jetzt erneut 40 µl pro Vertiefung auf die Mikrotiterplatte gegeben, nochmals gut durchgemischt und die Platten in einem Plastikbeutel, damit das Medium nicht verdampfte, für 24 Std. im Brutschrank (37°C) inkubiert.

Das ganze Verfahren wurde unter sterilen Kautelen unter einem Lamina-Flow-Apparat durchgeführt, um eine Infektion und damit Zugrundegehen der Zellkultur zu vermeiden.

2.5.3. Ernten der Zellen und Zählen der eingebauten ^3H -Thymidin-Aktivität

Am nächsten Tag wurden die Platten 10 min bei 1900 rpm zentrifugiert, der Überstand mit einer Spezialapparatur abgesaugt und in jede Vertiefung 150 µl 0,25%iges Trypsin gegeben. Nach einer Inkubation von 10 min bei 37°C wurden mit einem anderen Spezialapparat die gelösten Zellen mit Aqua dest. aus ihren Vertiefungen herausgespült und auf Spezialfilterplättchen gefiltert.

Diese Plättchen wurden getrocknet und jeweils eines in ein Szintillationsfläschchen gebracht, 7 ml Szintillationsflüssigkeit daraufpipettiert und im Liquid-Scintillation-Counter gezählt.

3. ERGEBNISSE

3.1. Immunfluoreszenz

Alle Seren wurden nach dem gleichen Prinzip getestet und beurteilt.

Um gute Vergleichsmöglichkeiten zu haben, wurden Spezialobjektträger von Cooke verwendet, mit denen sich auf einem Objektträger jeweils 6 Verdünnungen des entsprechenden Serums und ein negatives und positives Vergleichsserum betrachten und beurteilen ließen. So konnten auch evtl. auftretende Fehler beim Beschichten, Inkubieren und Spülen ausgeschlossen werden, da sich die zu vergleichenden Seren ja alle auf einem einzigen Objektträger befanden.

Es wurde jeweils der Grenztiter bestimmt, der noch Fluoreszenz aufwies.

Um falsch positive Ergebnisse wegen Eigenfluoreszenz zu vermeiden, wurde ein Serum erst ab einem Titer von 1:40 getestet und konnte damit erst ab diesem Wert als "positiv" bezeichnet werden.

Die Serumverdünnungen wurden nach folgendem Schema aufgetragen:

Vertiefung 1:	Normalserum = Immunfluoreszenz negatives Serum Verdünnung 1:40
Vertiefung 2:	Testserum Verdünnung 1:40
Vertiefung 3:	Testserum Verdünnung 1:80
Vertiefung 4:	Testserum Verdünnung 1:160
Vertiefung 5:	Testserum Verdünnung 1:320
Vertiefung 6:	Testserum Verdünnung 1:640
Vertiefung 7:	Testserum Verdünnung 1:1280
Vertiefung 8:	Anti-B16-Serum vom Kaninchen Verdünnung 1:160 = Immunfluoreszenz positives Serum

3.1.1. Normalseren

Das Serum der normalen C57 Bl-Mäuse (ohne Tumoren = Maus-Normalserum) bzw. der normalen unbehandelten Kaninchen (= Kaninchen-Normalserum) ergab in allen Konzentrationen keine Fluoreszenz.

Als negatives Vergleichsserum wurde ebenfalls jeweils das Normalserum mit dem Titer 1:40 verwendet, um auch hier eine mögliche geringe Eigenfluoreszenz zu vermeiden.

3.1.2. Spezifische Antiseren

3.1.2.1. Anti-B16-Kaninchen-Serum

Das Serum des mit B16-Zellen immunisierten Kaninchens (=Anti-B16-Kaninchen-Serum) zeigte eine starke Fluoreszenz, die bis zu einem Titer von 1:2560 positiv war.

3.1.2.1.1. nach in vitro-Absorption

Der Titer des Anti-B16-Kaninchen-Serums verringerte sich nach Absorption mit normalem Mäusegewebe, d.h. Herausfiltern der Antikörper, die allgemein gegen Mäusegewebe gerichtet waren, auf 1:640 und nach nochmaliger Absorption mit B16-Tumorgewebe auf einen Wert von 1:80.

3.1.2.1.2. nach in vivo-Absorption

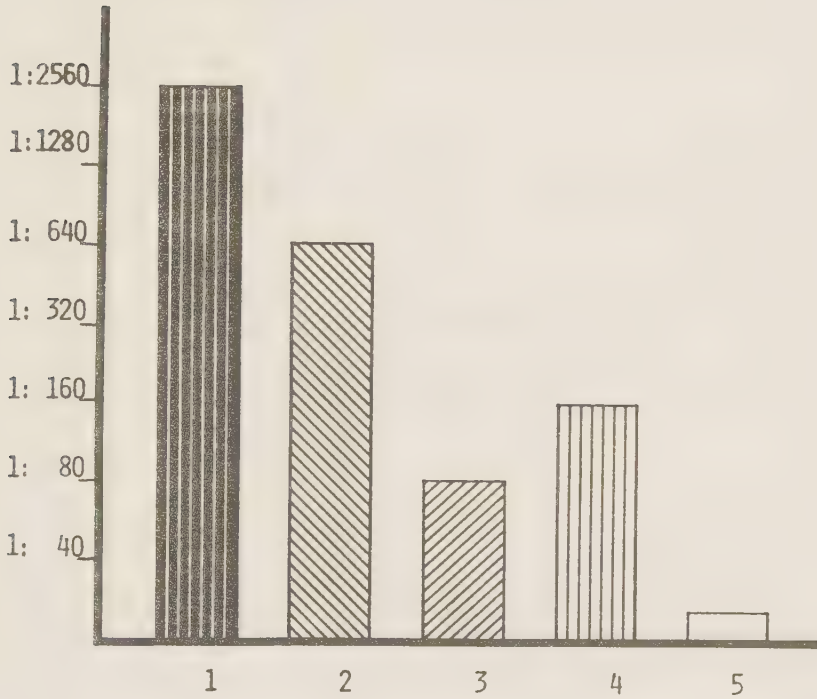
Anti-B16-Kaninchen-Serum zeigte nach der in vivo-Absorption nur noch einen Titer von 1:160 und nach zusätzlicher Absorption mit B16-Tumorgewebe war bei 1:40 keine spezifische Fluoreszenz mehr nachweisbar.

3.1.2.2. Anti-B16-Maus-Serum

Es gelang leider nicht, die C57 Bl-Mäuse mit den injizierten, bestrahlten B16-Melanomzellen zu immunisieren, d.h. die Fluoreszenz war auch bei niedrigem Titer (1:20) negativ.

IMMUNFLUORESCENZ

B16-ANTIKÖRPER IN KANINCHENSEREN



 1 ANTI-B16-KAN-SERUM

 2 ANTI-B16-KAN-SERUM MIT NORMALEM MÄUSEGEWEBE ABSORBIERT

 3 ANTI-B16-KAN-SERUM 1. MIT NORMALEM MÄUSEGEWEBE ABSORBIERT, 2. MIT B16-TUMORGEWEBE ABSORBIERT

 4 ANTI-B16-KAN-SERUM IN VIVO ABSORBIERT

 5 ANTI-B16-KAN-SERUM 1. IN VIVO ABSORBIERT, 2. MIT B16-TUMORGEWEBE ABSORBIERT

3.1.2.3. Anti-Maushaut-Kaninchen-Serum

Das Kaninchen, welches mit Maushaut immunisiert war, lieferte ein Serum (= Anti-Maushaut-Kaninchen-Serum) mit einem positiven Fluoreszenztiter von 1:640.

3.1.2.3.1. nach in vitro-Absorption

Dieses Serum mit normalem Mäusegewebe absorbiert, verringerte den Wert auf 1:320.

3.1.2.3.2. nach in vivo-Absorption

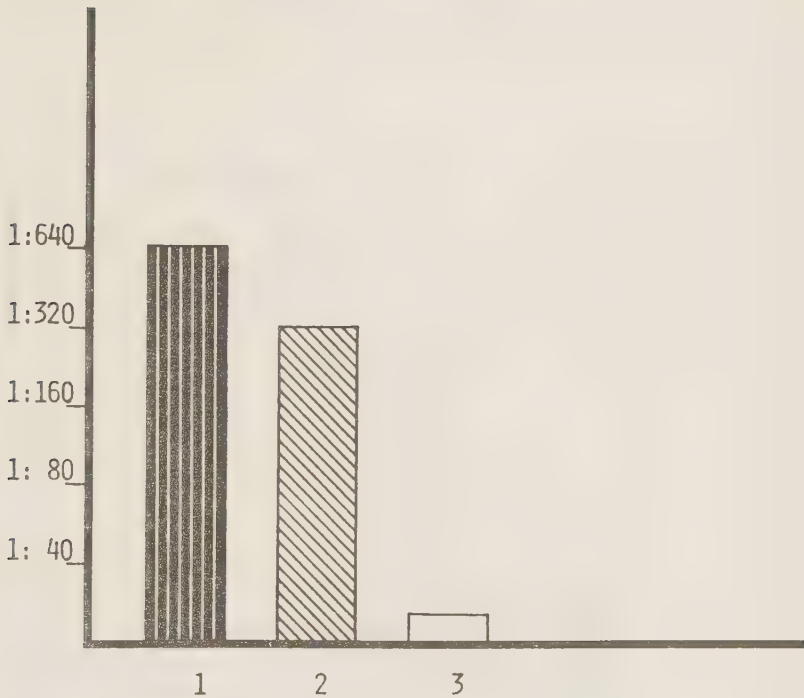
Bei der in vivo-Absorption verschwand die Fluoreszenz und war bei 1:40 nicht mehr nachweisbar.

3.1.2.4. Kontrollen

Kontrollen, die mit Normalserum vom Kaninchen, das einmal mit normalem Mäusegewebe und einmal mit B16-Tumorgewebe inkubiert wurde, durchgeführt wurden, verliefen negativ, zeigten also keine Fluoreszenz.

IMMUNFLUORESCENZ

ANTIKÖRPER GEGEN MAUSHAUT IN KANINCHEN-SEREN



1 ANTI-MAUSHAUT-KAN-SERUM



2 ANTI-MAUSHAUT-KAN-SERUM MIT NORMALEM MÄUSEGEWEBE
ABSORBIERT



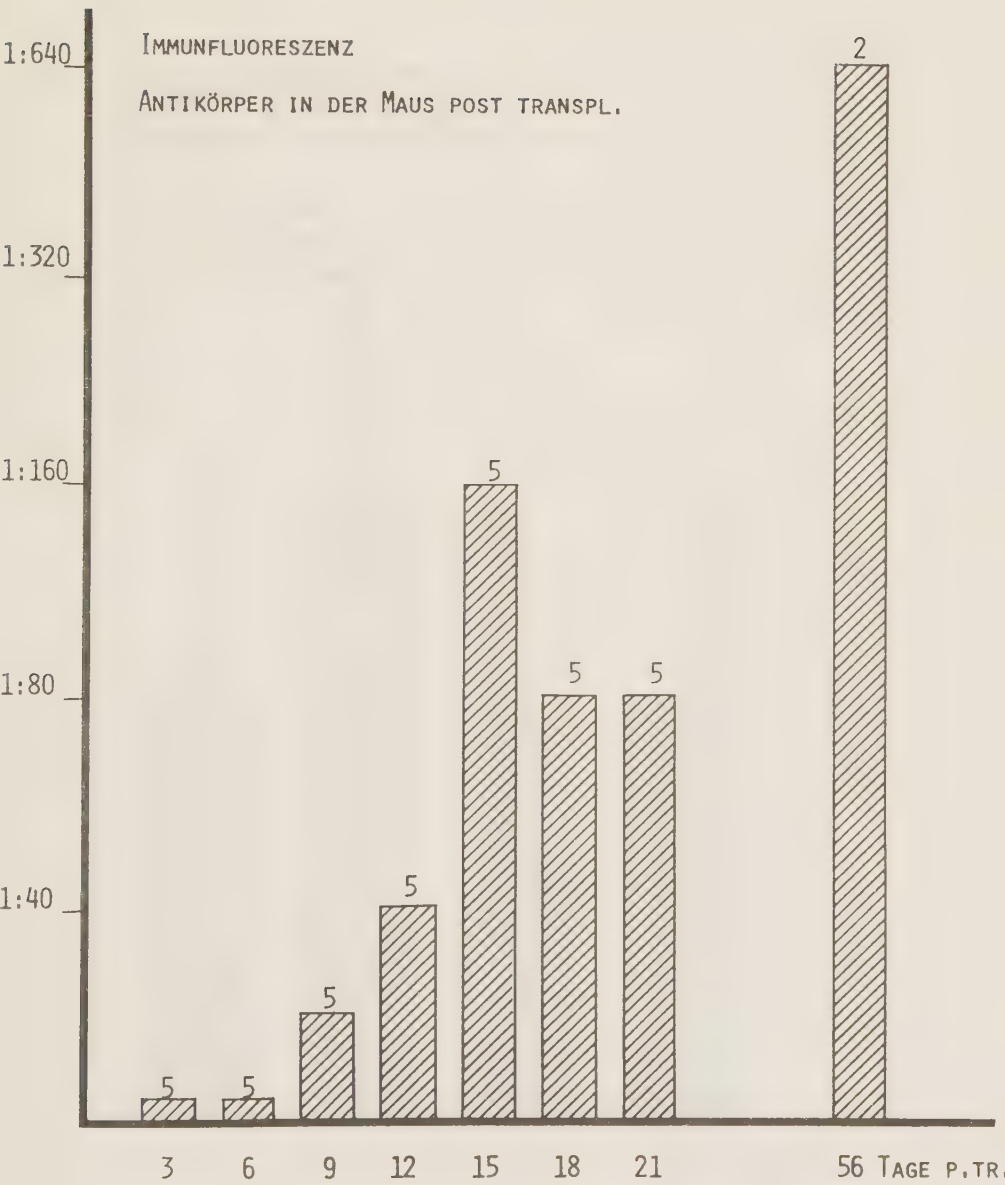
3 ANTI-MAUSHAUT-KAN-SERUM IN VIVO ABSORBIERT

3.1.3. Seren von Tumorträgern

Die Antikörpertiter der Mäuseseren waren bei mit B16-Melanom transplantierten Tieren bis Tag 6 bei 1:40 negativ, stiegen dann langsam im Titer an, erreichten an Tag 15 ein Maximum von 1:160 und fielen dann langsam wieder ab.

3.1.4. Seren von Mäusen mit verzögert aufgetretenem Tumor

Ein überraschendes Ergebnis brachten die zwei Seren von Mäusen, bei denen der Tumor nach Transplantation nicht in der üblichen Zeit, sondern erst sechs Wochen später angegangen war, die beide Fluoreszenz bis zu einem Titer von 1:640 zeigten.



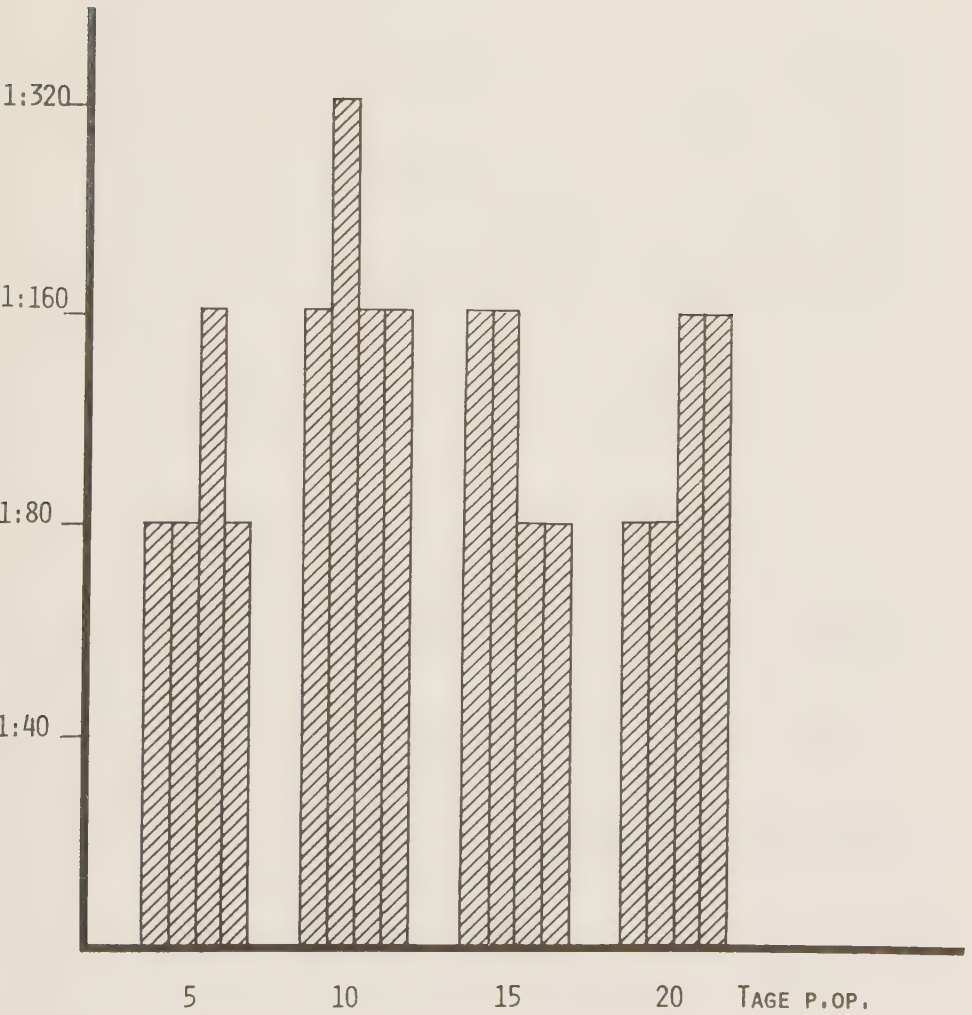
3.1.5. Seren von Tumor exzidierten Mäusen

Nach Transplantation und anschließender Entfernung des B16-Melanoms bei etwa Kirschkergröße konnte ein Ansteigen des Antikörpertiters bei den C57 Bl-Mäusen festgestellt werden.

Obwohl in diesem Fall die Mäuseseren individuell, und nicht gepoolt, getestet wurden, ließ sich bei allen Tieren ein Titer zwischen 1:80 und 1:320, unabhängig vom Zeitpunkt der Blutentnahme, bestimmen.

IMMUNFLUORESCENZ

ANTIKÖRPER IN DER MAUS P. OP.



3.2. ^3H -Thymin-Einbauhemmtest

Mit dem ^3H -Thymin-Einbauhemmtest kann die Aktivität der Zellen, also Wachstum, Vermehrung und Stoffwechsel, gemessen werden. Die Zellen bauen u.a. das ihnen angebotene, markierte ^3H -Thymin ein und nach der vorgegebenen Zeit, in diesem Fall 24 Stunden, kann mit einem Meßgerät die Menge inkorporierten ^3H -Thymidins durch seine Radioaktivität bestimmt werden.

Werden die Zellen in ihrer Aktivität gehindert, also der Stoffwechsel vermindert oder aufgehoben (wie hier durch Zugabe von Antikörpern gegen die Zellen), so bauen sie weniger oder gar kein markiertes ^3H -Thymin ein, und die Werte der gemessenen Radioaktivität verringern sich prozentual zur Verringerung des Stoffwechsels.

Als Ausgangswert wurde die Aktivitätsrate genommen, die bei Zugabe von Normalserum, das ja keine Antikörper enthielt, in der jeweiligen Verdünnung erzielt werden konnte.

Bei Vorhandensein von spezifischen Antikörpern verringerte sich diese Rate relativ zur Anzahl bzw. Konzentration der Antikörper in dem zugegebenen Serum, d.h. je niedriger die Counts per minute (cpm) waren, um so niedriger war der Stoffwechsel der Zellen und um so höher war die Hemmung der Zellen durch Antikörper.

Um mögliche toxische Komponenten, z.B. des Komplements oder des fötalen Kälberserums (FKS), zu vermeiden, wurden bei jedem Versuchsansatz Kontrollen mitgeführt, die bei Zugabe oder Weglassen des Komplements bzw. des FKS keine Veränderung der höchsten Einbaurate erbringen durften.

Aus dem gleichen Grund wurden, wie bei der Immunfluoreszenz, die Seren erst ab einer Verdünnung von 1:40 getestet bzw. gewertet.

In jeweils drei aufeinanderfolgenden Vertiefungen der Mikrotestplatten wurde dasselbe Serum in derselben Konzentration getestet. Die somit zu erwartenden gleichen Ergebnisse in cpm wurden gemittelt und ins Verhältnis zum Wert des Normalserums der gleichen Konzentration gesetzt.

Je höher also die Anzahl der spezifischen Antikörper in dem zu testenden Serum war, um so niedriger waren die zu erwartenden cpm und um so höher war die Reduktion der Einbaurate in Prozent gegenüber dem Normalserum ohne spezifische Antikörper.

3.2.1. Spezifische Antiseren

3.2.1.1. Anti-B-16-Kaninchen-Serum

Die höchste Reduktion von nahezu 100% ergab erwartungsgemäß das Anti-B16-Serum vom Kaninchen.

3.2.1.1.1. nach in vitro-Absorption

Durch die Absorption mit normalem Mäusegewebe verringerte sich die Reduktion nicht in dem erwartendem Ausmaß und erreichte auch nach der Inkubation mit B16-Tumorgewebe nicht den angestrebten Nullpunkt.

3.2.1.1.2. nach in vivo-Absorption

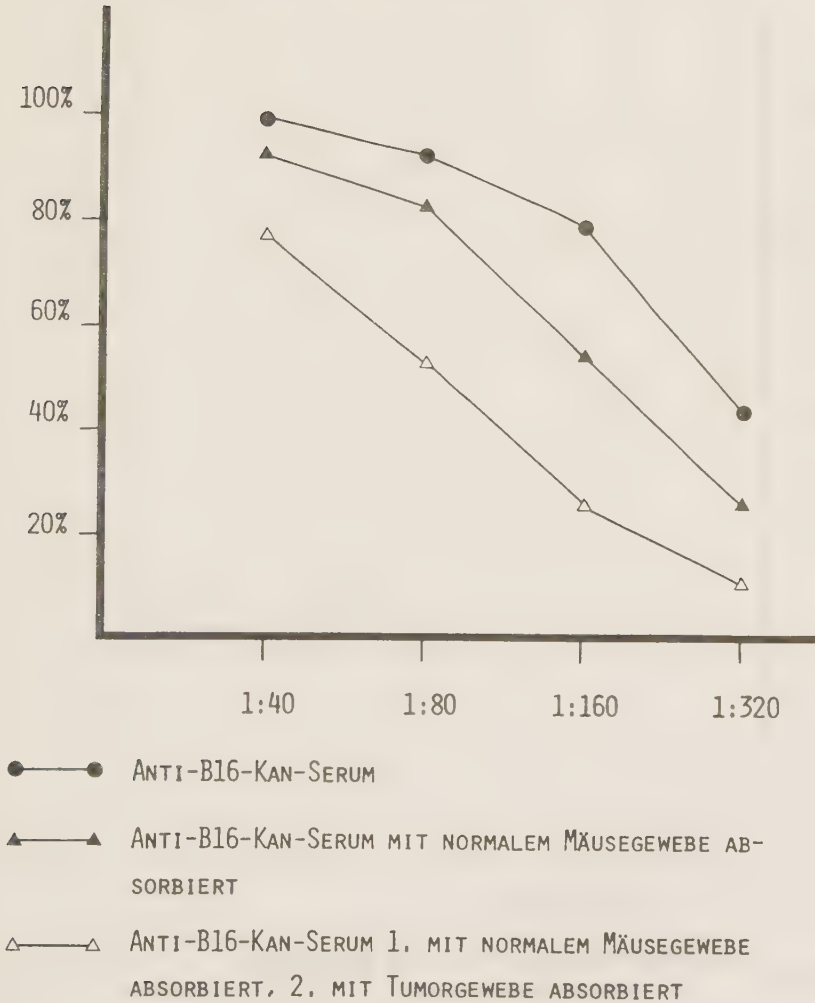
Anders verhielt es sich bei der in vivo-Absorption, bei der niedrige Werte erreicht wurden, die nach zusätzlicher Absorption mit B16-Tumorgewebe quasi die Werte des Normalserums erreichten.

3.2.1.2. Anti-B16-Maus-Serum

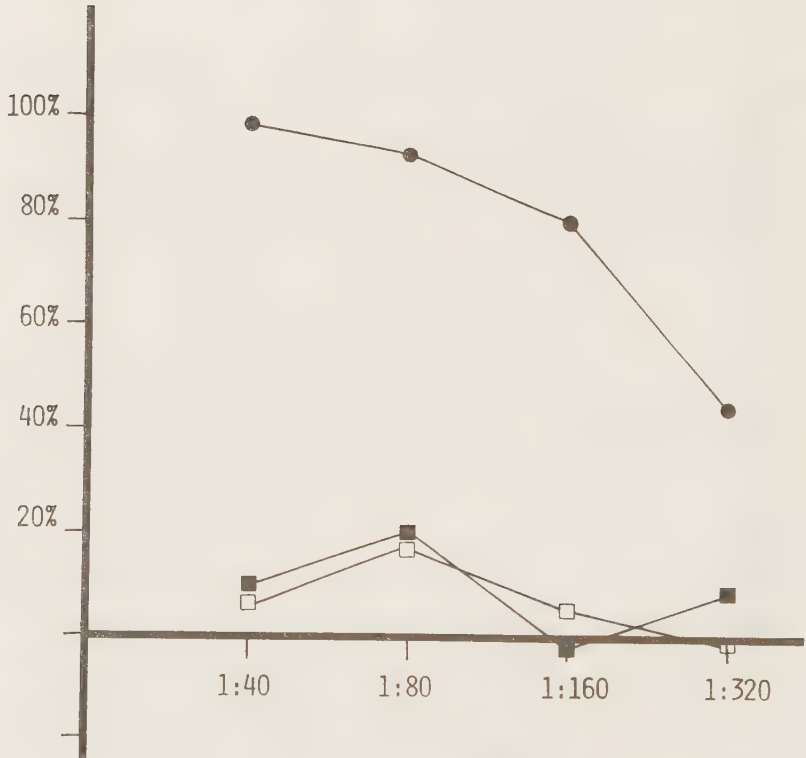
Ebenso wie bei der Immunfluoreszenz konnten mit dem ^3H -Thymidin-Einbauhemmtest in dem Anti-B16-Serum der Maus keine Antikörper nachgewiesen werden, d.h. das Serum verhielt sich genauso wie das Maus-Normalserum.

^3H - THYMIDIN - EINBAUHEMMTEST

B16-ANTIKÖRPER IN KANINCHENSEREN



^3H - THYMIDIN - EINBAUHEMMTEST
B16-ANTIKÖRPER IN KANINCHEN-SEREN



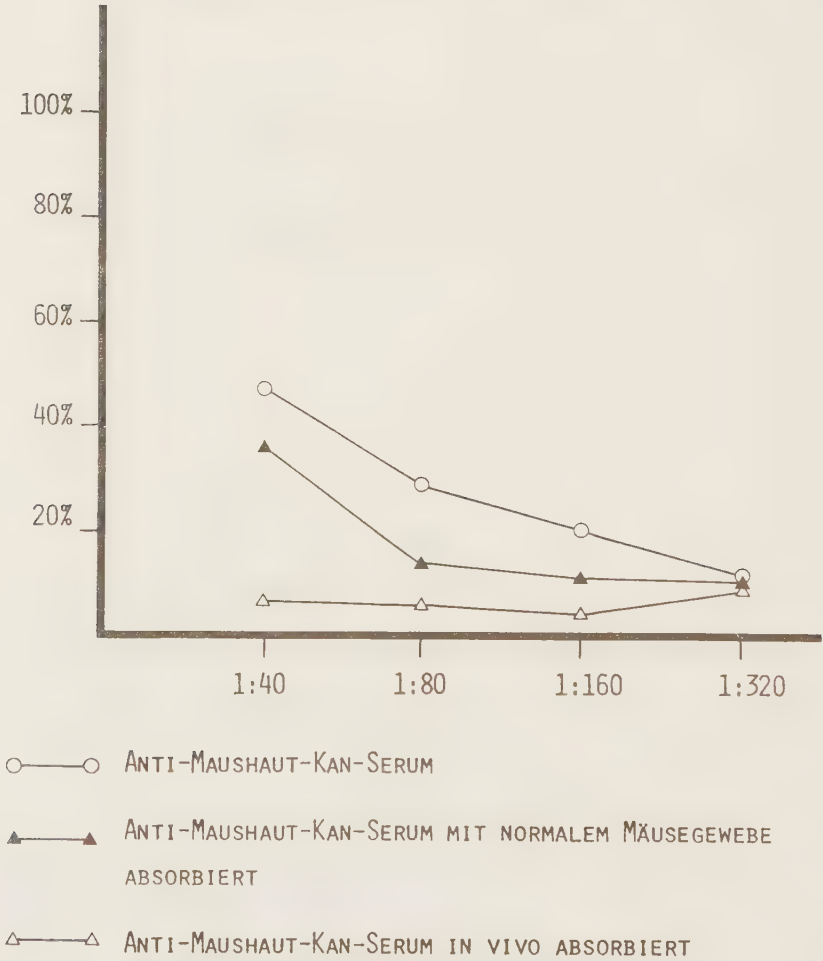
- — ● ANTI-B16-KAN-SERUM
- — ■ ANTI-B16-KAN-SERUM IN VIVO ABSORBIERT
- — □ ANTI-B16-KAN-SERUM 1. IN VIVO ABSORBIERT, 2. MIT TUMORGEWEBE ABSORBIERT

3.2.1.3. Anti-Maushaut-Kaninchen Serum

Das Anti-Maushaut-Serum des Kaninchens ergab nach Absorption mit normalem Mäusegewebe nur eine teilweise Verringerung der Werte, bei der in vivo-Absorption näherte sich die Kurve der Nulllinie, also dem Kaninchen-Normalserum.

^3H - THYMIDIN - EINBAUHEMMTEST

ANTIKÖRPER GEGEN MAUSHAUT IN KANINCHENSEREN



3.2.2. Seren von Tumorträgern

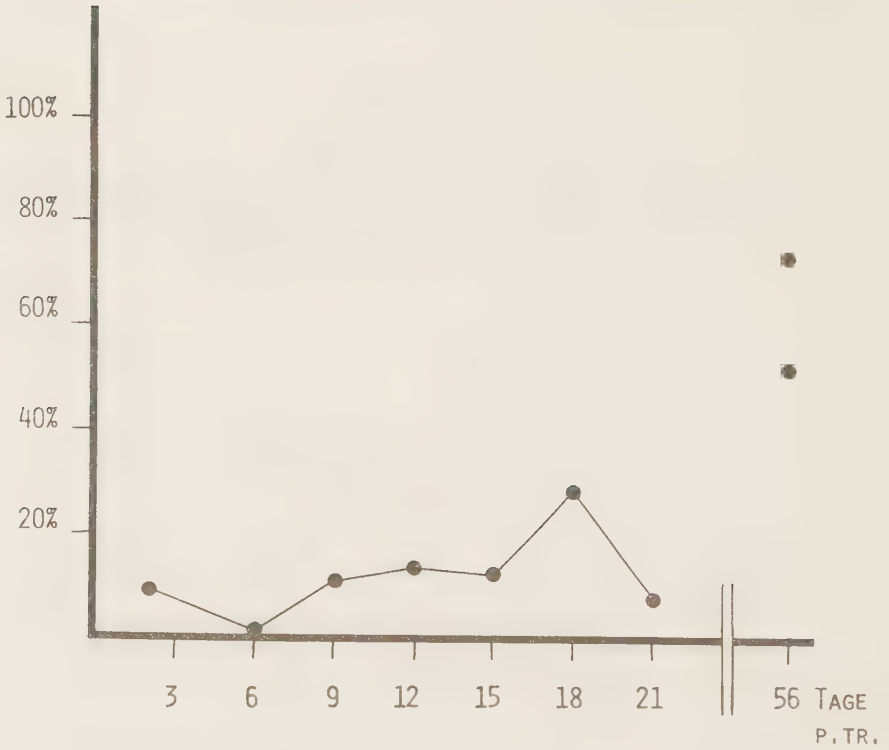
Nach Transplantation des B16-Melanoms auf C57 Bl-Mäuse konnte mit dem ^3H -Thymidin-Einbauhemmtest ein Anstieg der spezifischen Antikörper gegen das B16-Melanom mit einem Maximum am Tag 18 nachgewiesen werden.

3.2.3. Seren von Mäusen mit verzögert aufgetretenem Tumor

Bei den Seren der zwei Mäuse, deren Tumor verspätet erst nach sechs Wochen angegangen war, konnte auch in diesem Test ein hoher Antikörpertiter nachgewiesen werden.

^3H - THYMIDIN - EINBAUHEMTEST

B16-ANTIKÖRPER IN DER MAUS POST TRANSPL.



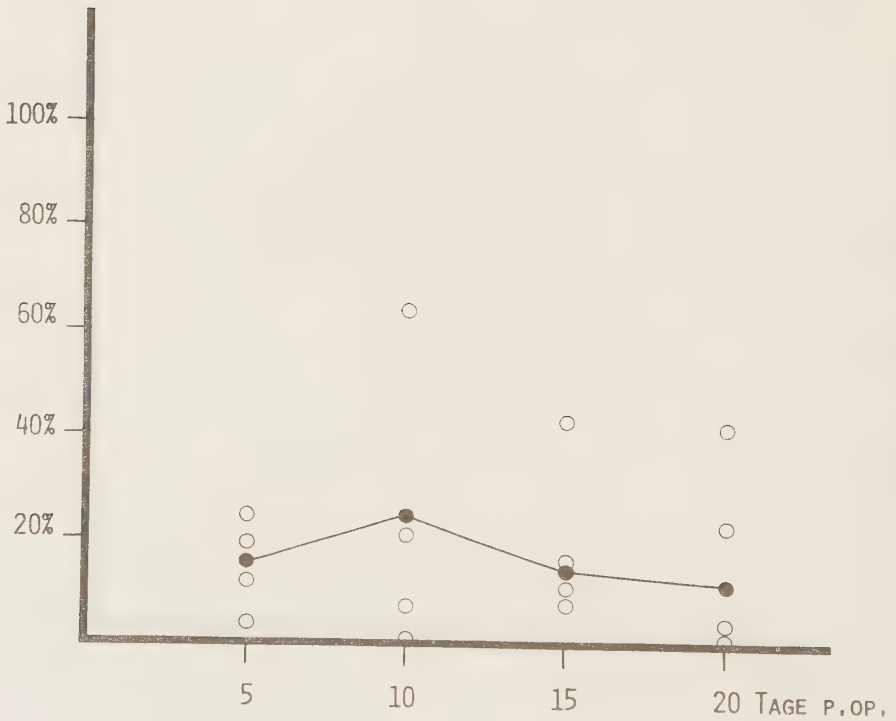
SERUMVERDÜNNUNG 1:40

3.2.4. Seren von Tumor exzidierten Mäusen

Auch bei den Tieren, denen der Tumor wieder entfernt worden war, ergaben sich zum Teil hohe Antikörper-Titer, die jedoch individuell sehr variierten, da ja in diesem Fall die jeweiligen Seren nicht gepoolt waren, sondern einzeln bestimmt wurden.

^3H - THYMIDIN - EINBAUHEMMTEST

B16 ANTIKÖRPER IN DER MAUS POST OP.



SERUMVERDÜNNUNG 1:40

4. DISKUSSION

Der Verlauf der Antikörpertiterkurve während des Anwachsens und Größerwerdens des B16-Melanoms in der Maus zeigt sowohl mit der Immunfluoreszenz als auch im ^3H -Thymidin-Einbauhemmtest einen langsamen Anstieg der Antikörper mit einem Höchstwert an Tag 15 bzw. 18, um danach wieder abzusinken.

Bystrin (7) kam in etwa zu dem gleichen Ergebnis. Er entwickelte einen Doppelantikörper-Radioimmunassay und wies die ersten Antikörper einer C57 Bl-Maus gegen transplantiertes B16-Melanom eine Woche nach Inokulation des Tumors nach. Etwa drei Wochen danach ergab sich ein Höhepunkt und anschließend fielen die Antikörper wieder ab, während der Tumor größer wurde.

Bei menschlichen malignen Melanomen wurden von einigen Autoren ähnliche Beobachtungen gemacht. Solange der Tumor lokalisiert, d.h. in Stadium I oder II (nur Metastasen in lokalen Lymphknoten) war, fand man zytotoxische Antikörper (4, 8, 36, 37, 39), die bei Übergang in das Stadium III (Fernmetastasen) bzw. schon eine Weile vor der klinischen Manifestation nicht mehr nachweisbar waren.

Anfangs meinte man, daß die nicht mehr vorhandenen Antikörper von den entstehenden Tumormassen gebunden werden, Bodurtha (4), Lewis (39) und Canevari (8) konnten jedoch nur eine Abhängigkeit von der Tumorausbreitung finden, da selbst bei Patienten mit lokal großen Tumormassen Antikörper vorhanden waren, während bei auch nicht ausgedehnter hämatogener Metastasierung alle Antikörper verschwanden (4, 8, 39) bzw. zumindest signifikant abnahmen (45). Lewis (39, 40) und Ikonopisov (33) postulierten daher, daß die humoralen Antikörper vor allem den Organismus vor hämatogener Aussaat bewahren.

Offensichtlich haben sie also keinen Einfluß auf das Wachstum des Melanoms als solider Tumor, da sie dorthin auch nicht in ausreichender Konzentration gelangen und die Bedingungen nicht günstig sind, um zytotoxische Aktivitäten zu entfalten (33).

Die zytotoxischen Antikörper im Serum sollen vor allem den Übergang von Stadium II in Stadium III, also die Fernmetastasierung verhindern, und in dem Moment, in dem die ins Blut freigesetzten Melanomzellen nicht mehr zerstört werden, da keine Antikörper mehr vorhanden sind, können sich Fernmetastasen bilden (33).

Lewis (39, 40) ist der Meinung, daß zwar die Bedeutung der zellulären Abwehr in der Frühphase des Tumors, solange er sich als solider Tumor entwickelt und wächst, unumstritten ist. Das Hauptanliegen bei jeder malignen Erkrankung ist jedoch das Weiterschreiten der Erkrankung, die Metastasierung in andere Organe, zu vermeiden und hier hält er die humoralen Antikörper für ein wichtiges Instrument, um das zu verhindern.

Warum die Antikörper verschwinden, ist nicht eindeutig geklärt. Bystryn (7) konnte für das B16-Melanom in der Zellkultur nachweisen, daß Antigene aus der Zelle freigesetzt werden, die die zirkulierenden Antikörper binden, die somit für ihre eigentliche Aufgabe, die zytotoxische Aktivität, nicht mehr zur Verfügung stehen.

Die These, wie anfangs schon erwähnt, daß der Tumor selbst die Antikörper wie ein Schwamm aufsaugt und an die zellständigen Antigene bindet, wurde von Lewis (37) widerlegt, da es ihm mit direkter Immunfluoreszenz nicht möglich war, IgG oder IgM auf den Tumorzellen darzustellen.

Ein Wiederauftreten von humoralen Antikörpern, nachdem sie in einem disseminierten Stadium nicht mehr nachweisbar waren, ist jedoch auch möglich. Ikonopisov (33) konnte bei Melanompatienten im Stadium III Antikörper erzeugen, indem er ihnen an vielen Stellen des Körpers subcutan bestrahlte autologe Melanomzellen injizierte. Die Antikörper waren allerdings nur maximal bis zu einem Zeitraum von 14 Tagen nachweisbar und ein Effekt auf das Fortschreiten der Erkrankung (Hemmung oder Förderung) konnte nicht festgestellt werden.

Ein weiteres Problem werfen sog. blockierende Faktoren im Serum auf. Hellström (23) und Sjögren (59), die davon ausgehen, daß nur die zellvermittelten Immunreaktionen für die Tumorabwehr wichtig sind, stellten fest, daß die Lymphozyten während aller Stadien des Tumors, also auch bei disseminierter Metastasierung, *in vitro* zytotoxisch sind. Wird jedoch Serum von demselben Patienten, von dem die getesteten Lymphozyten stammen, zu dem Testansatz aus Melanomtargetzellen und Lymphozyten gegeben, und befindet sich dieser Patient in Stadium III, so wird die Zytotoxizität aufgehoben (23, 24, 29, 59).

Es existieren mehrere Theorien für dieses Phänomen. Auf jeden Fall muß sich in dem Serum eine blockierende Substanz befinden. Diese Substanz besteht möglicherweise aus nicht zytotoxischen Antikörpern, die sich auf die Targetzellen setzen und somit die Antigene maskieren und für die Lymphozyten nicht mehr erkennbar und damit angreifbar machen. Die zweite Möglichkeit, die vor allem Sjögren (59) nachzuweisen glaubte, geht davon aus, daß sich freigesetztes Antigen mit zirkulierenden Antikörpern verbindet (s.o.) und daß sich dieser Komplex auf die sensibilisierten Lymphozyten heftet und sie somit in ihrer Funktion hindert.

Als Drittes käme noch in Frage, daß sich das freie Antigen alleine, ohne Antikörper, an die Lymphozyten bindet und sie von ihrer zytotoxischen Aufgabe fernhält.

Dieses Blockieren, auch "Enhancement" genannt, wird von Hellström (24, 26, 27, 28) verantwortlich gemacht für ein progressives Tumorwachstum und damit stehen sich zwei völlig gegensätzliche Meinungen in Bezug auf die Rolle der Antikörper gegenüber.

Einmal eine synergistische in dem System der Tumorabwehr durch den Nachweis einer Zytotoxizität (36), das andere Mal eine antagonistische durch die Darstellung einer Hemmung der Zytotoxizität der Lymphozyten (allerdings nur in vitro) und damit eine postulierte Förderung des Tumorwachstums in vivo (24, 26, 27, 28, 59).

In dieser Arbeit wurde von dem zytotoxischen Charakter der Antikörper ausgegangen, ohne behaupten zu wollen, daß vielleicht nicht zusätzlich auch noch blockierende Antikörper oder Antikörperkomplexe vorhanden waren. Die zytotoxische Komponente konnte auch durch den ^3H -Thymidin-Einbauhemmtest dargelegt werden, der ja auf der Basis der Zellzerstörung oder zumindest der Hemmung eines weiteren Zellstoffwechsels, was letztendlich ja auch einer Zellvernichtung gleichkommt, funktioniert.

Die C57 Bl-Mäuse, denen ihr Tumor etwa zur Zeit des größten nachgewiesenen Antikörpertiters entfernt wurde, hatten auch nach der Exzision relativ hohe Antikörper (im Schnitt sogar etwas höhere), die auch in den folgenden drei Wochen p. op. nicht absanken.

Canevari (8) stellte bei den wenigen Patienten, die auch im Stadium I keine nachweisbaren Antikörper hatten, nach der Operation, der Exzision des Melanoms, plötzlich einen positiven Antikörpertiter fest. Nach einiger Zeit (maximal drei Monate) verschwand dieser jedoch wieder und war nicht nachweisbar, solange die Patienten klinisch tumorfrei waren. Canevari geht davon aus, daß der Antigenstimulus unter eine gewisse Schwelle gerät, weil z.B. nicht genug antigenträgende Tumorzellen vorhanden sind und daß deshalb nicht mehr ausreichend Antikörper produziert werden, um sie nachweisen zu können.

Im Gegensatz dazu fand Morton (44, 45) bei seinen Patienten, daß die Antikörper nach der operativen Entfernung des Melanoms und eventueller Lymphknoten ebenfalls anstiegen bzw. auf ihrem hohen Wert blieben, dann aber erst mit dem Wiederfortschreiten der Erkrankung, d.h. Auftauchen von viszerale Metastasen, absanken. Bei einem Patienten, der rezidivfrei blieb, konnten auch weiterhin hohe Antikörperspiegel bestimmt werden.

Dies entspricht den relativ hohen Antikörpertitern bei den Tumor exzidierten C57 Bl-Mäusen, wobei man jedoch einwenden muß, daß der Betrachtungszeitraum nach der Exzision der Melanome vielleicht etwas kurz gewählt war, um sich eindeutig der Auffassung von Morton anzuschließen.

Eine Möglichkeit, Tumorantigene nachzuweisen, ist die Erzeugung von Antikörpern in einem allogenen oder xenogenen Organismus. Die allogene Erzeugung ist beim Menschen aus humanitären Gründen nicht möglich, deshalb steht der Tierversuch im Vordergrund.

Um ein entsprechendes Modell zu haben, wurde mit dem B16-Maus-Melanom ein Kaninchen immunisiert und das so gewonnene Anti-B16-Melanom-Kaninchen-Serum verschiedenen Absorptionen unterzogen. Mit normalem Mäusegewebe, in diesem Fall Mäuseliefer, sollten die gegen die normalen Mäuse-Histokompatibilitätsantigene gerichteten Antikörper absorbiert werden.

Der Antikörpertiter verringerte sich in der Tat (sowohl in der Immunfluoreszenz wie auch beim ^3H -Thymidin-Einbauhemmtest), die übriggebliebenen Antikörper müßten also jene sein, die gegen das zusätzliche Antigen, das Tumorantigen, gerichtet sind. Theoretisch hätten sich diese Antikörper mit einer weiteren Absorption, diesmal mit B16-Melanomzellen, herausabsorbieren lassen müssen, es gelang jedoch nur eine weitere Minderung des Titers.

Anders verlief die in vivo-Absorption. In der Immunfluoreszenz wurden die Antikörper nach in vivo-Absorption wesentlich stärker als in vitro mit normalem Mäusegewebe verringert und waren nach der anschließenden Inkubation mit B16-Tumorgewebe überhaupt nicht mehr nachweisbar.

Der ^3H -Thymidin-Einbauhemmtest ergab Vergleichbares, nur sanken die Antikörper hier nach der in vivo-Absorption noch stärker ab.

Trotz aller Interpretationsschwierigkeiten läßt sich feststellen, daß immunologische Vorgänge das Wachstum von Tumoren beeinflussen, gleich ob positiv oder negativ, und daß umgekehrt aus der Stärke der immunologischen Antwort, sprich Reaktivität des zellvermittelten Vorgangs und Höhe des humoralen Antikörpertiters, auf die Möglichkeit der Einflußnahme des Organismus rückgeschlossen werden kann.

So scheinen für die Beobachtung des individuellen Krankheitsverlaufs bei malignen Melanomen beide in dieser Arbeit angewandten Testverfahren, indirekte Immunfluoreszenz und ^3H -Thymidin-Einbauhemmtest, geeignet zu sein.

Beim Immunfluoreszenztest tritt die Schwierigkeit auf, genügend histologische Schnitte vom Operationspräparat zu machen und tiefgefroren aufzubewahren, um dann in bestimmten Zeitabständen eine Veränderung im Antikörpertiterverlauf des Serums feststellen zu können. Es ist ratsam als Präparat Schnitte des jeweils eigenen Melanoms zu verwenden, da die meisten Autoren keine kreuzreagierenden Antigene bzw. Antikörper bei menschlichen Melanomen finden konnten (38).

Der ^3H -Thymidin-Einbauhemmtest verlangt aus den gleichen Gründen, daß von dem jeweiligen Melanom Zellkulturen angelegt bzw. die lebenden Zellen mit geeigneten Methoden eingefroren werden, um immer die adäquaten Tumorzellen zum Test zur Verfügung zu haben.

Das Einsetzen von Zellkulturen von soliden menschlichen Tumoren ist allerdings erst im Stadium der Entwicklung. Heppner (30) gibt für sein Labor an, daß nur 20% der Kulturen angehen und auch dann ist nicht gesichert, daß sie viele Passagen überleben.

Beide Tests bieten den Vorteil relativ einfach und sensitiv zu sein. Man verbraucht jeweils wenig Material, sowohl was die Anzahl der Tumorzellen als auch die Menge des Serums betrifft, und deshalb würden sie sich zur Überwachung von Melanompatienten eignen.

5. BEGRIFFSERLÄUTERUNGEN

allogen:	artgleich, jedoch genetisch fremd
Antagonismus:	gegenseitige Beeinflussung im Sinne einer entgegengerichteten Wirkung
autolog:	vom selben Individuum stammend
Histokompatibilität:	Gewebeverträglichkeit, genetisch fixiert; z.B. HLA- und ABO-System beim Menschen
immunologic surveillance:	eine der Funktionen des Immunsystems, die darin besteht, anomale (z.B. durch somatische Mutation entstandene) Zellen kontinuierlich und rasch aus dem Organismus zu entfernen
Inzucht-Mäuse:	genetisch identische Mäuse
maligne Transformation:	Umwandlung einer normalen Zelle in eine maligne Zelle, z.B. durch Änderung der DNA- bzw. RNA-Sequenz in der genetischen Information der Zelle
Synergismus:	gegenseitige Beeinflussung im Sinne einer additiven oder potenzierenden Wirkung
xenogen:	von einer anderen Tierspezies herstammend

6. ZUSAMMENFASSUNG

Humorale Antikörper gegen B16-Melanome in C57 Bl-Mäusen und in Kaninchen können mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz und durch den ^3H -Thymidin-Einbauhemmtest nachgewiesen werden. Während der Anwachsphase der Tumortransplantate ergeben sich Antikörperanstiege in C57 Bl-Mäusen mit Gipfeln nach 15 bzw. 18 Tagen. Nach operativer Entfernung des Tumors bleiben die Antikörpertiter bestehen. Bei verzögert anwachsenden Tumoren fallen besonders hohe Antikörpertiter auf. Der Nachweis tumorspezifischer Antikörper gegen B16-Melanome bei sensibilisierten Kaninchen gelingt sowohl nach in-vitro- als auch nach in-vivo-Absorption.

Beide Testmethoden eignen sich unter gewissen Voraussetzungen, individuelle Antikörpervläufe auch bei an malignen Melanomen erkrankten Patienten zu verfolgen.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- (1) **Ambrosius H.**, Rudolph W.: Grundriß der Immunbiologie, VEB Gustav Fischer Verlag Jena, 1978
- (2) **Beverley P.C.L.**, Lowenthal R.M., Tyrrell D.A.J.: Immune responses in mice to tumor challenge after immunization with newcastle disease virus-infected or X-irradiated tumor cells or cell fractions. *Int. J. Cancer* 11: 212-223, 1973
- (3) **Bluming A.Z.**, Vogel C.L., Ziegler J.L., Kiryabwire J.W.M.: Delayed cutaneous sensitivity reactions to extracts of autologous malignant melanoma: A second look. *J. Nat. Cancer Inst.* 48: 17-24, 1972
- (4) **Bodurtha A.J.**, Chee D.O., Laucius J.F. Mastrangelo M.J., Prehn R.T.: Clinical and immunological significance of human melanoma cytotoxic antibody. *Cancer Research* 35: 189-193, 1975
- (5) **Braun-Falco O.**: Maligne Melanome der Haut aus dermatologischer Sicht. *Chirurg* 45: 345-356, 1974
- (6) **Bystryn J.-C.**, Schenkein I., Uhr J.W.: Double-antibody radioimmunoassay for B16 melanoma antibodies. *J. Nat. Cancer Inst.* 52: 911-915, 1974
- (7) **Bystryn J.-C.**, Schenkein I., Baur S., Uhr J.W.: Partial isolation and characterization of antigen(s) associated with murine melanoma. *J. Nat. Cancer Inst.* 52: 1263-1269, 1974

- (8) **Canevari S.**, Fossati G., Della Porta G., Balzarini G.P.: Humoral cytotoxicity in melanoma patients and its correlation with the extent and course of the disease. *Int. J. Cancer* 16: 722-729, 1975
- (9) **Cleveland P.H.**, McKhann C.F., Johnson K., Nelson S.: A microassay for humoral cytotoxicity demonstrating sublethal effects of antibody. *Int. J. Cancer* 14: 417-426, 1974
- (10) **Cochran A.J.**, Mackie R.M., Thomas C.E., Grant R.M., Cameron-Mowat D.E., Spilg W.G.S.: Cellular immunity to breast carcinoma and malignant melanoma. *Br. J. Cancer* 28: 77-82, 1973
- (11) **Copeman P.W.M.**, Lewis M.G., Phillips T.M., Elliot P.G.: Immunological associations of the halo naevus with cutaneous malignant melanoma. *Brit. J. of Dermatology* 88: 127-137, 1973
- (12) **Cornain S.**, De Vries J.E., Collard J., Vennegoor C., van Wingerden I., Rümke P.: Antibodies and antigen expression in human melanoma detected by the immune adherence test. *Int. J. Cancer* 16: 981-997, 1975
- (13) **Currie G.A.**, Lejeune F., Fairley G.H.: Immunization with irradiated tumor cells and specific lymphocyte cytotoxicity in malignant melanoma. *Brit Med. J.* 2: 305-310, 1971
- (14) **Eilber F.R.**, Morton D.L.: Impaired immunologic reactivity and recurrence following cancer surgery. *Cancer* 25: 362-367, 1970

- (15) Elliot P.G., Thurlow B., Needham P.R.G., Lewis M.G.: The specificity of the cytoplasmic antigen in human malignant melanoma. *Europ. J. Cancer* 9: 607-610, 1973
- (16) Fossati G., Colnaghi M.I., Della Porta G., Cascinelli N., Veronesi U.: Cellular and humoral immunity against human malignant melanoma. *Int. J. Cancer* 8: 344-350, 1971
- (17) Fritze D., Kern D.H., Pilch Y.H.: Quantitation of cytotoxic antitumor antibody in vitro: A microassay with ¹²⁵I-Iododeoxyuridine as a tumor cell label. *J. Nat. Cancer Inst.* 53: 1403-1407, 1974
- (18) Fritze D., Kern D.H., Drogemuller C.R., Pilch Y.H.: Production of antisera with specificity for malignant melanoma and human fetal skin. *Cancer Research* 36: 458-466, 1976
- (19) Green E.L., Hrsg.: Handbook of genetically standardized jax mice. Bar Harbor, Me., Bar Harbor Times Publ Co., 1968
- (20) Hellström I., Hellström K.E., Pierce G.E., Yang J.P.S.: Cellular and humoral immunity to different types of human neoplasms. *Nature* 220: 1352-1354, 1968
- (21) Hellström I., Hellström K.E., Evans C.A., Heppner G.H., Pierce G.E., Yang J.P.S.: Serum-mediated protection of neoplastic cells from inhibition by lymphocytes immune to their tumor-specific antigens. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 62: 362-368, 1969
- (22) Hellström I., Hellström K.E., Sjögren H.C., Warner G.A.: Demonstration of cell-mediated immunity to human neoplasms of various histological types. *Int. J. Cancer* 7: 1-16, 1971

- (23) **Hellström I.**, Sjögren H.O., Warner G., Hellström K.E.: Blocking of cell-mediated tumor immunity by sera from patients with growing neoplasms. *Int. J. Cancer* 7: 226-237, 1971

- (24) **Hellström I.**, Hellström K.E., Sjögren H.O., Warner G.A.: Serum factors in tumor-free patients cancelling the blocking of cell-mediated tumor immunity. *Int. J. Cancer* 8: 185-191, 1971

- (25) **Hellström I.**, Hellström K.E.: Cellular immunity and blocking antibodies to tumors. *J. of Reticuloendothelial Society* 10: 131-136, 1971

- (26) **Hellström I.**, Hellström K.E.: Some recent studies on cellular immunity to human melanomas. *Federation Proceedings* 32: 156-159, 1973

- (27) **Hellström I.**, Warner G.A., Hellström K.E., Sjögren H.O.: Sequential studies on cell-mediated tumor immunity and blocking serum activity in ten patients with malignant melanoma. *Int. J. Cancer* 11: 280-292, 1973

- (28) **Hellström I.**, Hellström K.E., Warner G.A.: Increase of lymphocyte-mediated tumor-cell destruction by certain patient sera. *Int. J. Cancer* 12: 348-353, 1973

- (29) **Heppner G.H.**, Stolbach L., Byrne M., Cummings F.J., McDonough E., Calabresi P.: Cell-mediated and serum blocking reactivity to tumor antigens in patients with malignant melanoma. *Int. J. Cancer* 11: 245-260, 1973

- (30) **Heppner G.**, Henry E., Stolbach L., Cummings F., McDonough E., Calabresi P.: Problems in the clinical use of the microcytotoxicity assay for measuring cell-mediated immunity to tumor cells. *Cancer Res.* 35: 1931-1937, 1975

- (31) **Herberman R.B.**: In vivo and in vitro assays of cellular immunity to human tumor antigens. *Federation Proc.* 32: 160-164, 1973

- (32) **Hilgers J.**, Nowinski R.C., Geering G., Hardy W.: Detection of avian and mammalian oncogenic RNA viruses (oncornaviruses) by immunofluorescence. *Cancer Res.* 32: 98-106, 1972

- (33) **Ikonopisov R.L.**, Lewis M.G., Hunter-Craig I.D., Bodenham D.C., Phillips T.M., Cooling C.I., Proctor J., Fairley G.H., Alexander P.: Autoimmunization with irradiated tumor cells in human malignant melanoma. *Brit. Med. J.* 2: 752-754, 1970

- (34) **Klein G.**: Tumor antigens. *Ann. Rev. Microbiol.* 20: 223-252, 1966

- (35) **Kreider J.W.**, Bartlett G.L., Purnell D.M.: Inconsistent response of B16 melanoma to BCG immunotherapy. *J. Nat. Cancer Inst.* 56: 803-810, 1976

- (36) **Lewis M.G.**, Ikonopisov R.L., Nairn R.C., Phillips T.M., Fairley G.H., Bodenham D.C., Alexander P.: Tumour-specific antibodies in human malignant melanoma and their relationship to the extent of the disease. *Brit. Med. J.* 3: 547-552, 1969

- (37) **Lewis M.G.**, Phillips T.M., Cook K.B., Blake J.: Possible explanation for loss of detectable antibody in patients with disseminated malignant melanoma. *Nature* 232: 52-54, 1971

- (38) **Lewis M.G.**, Phillips T.M.: The specificity of surface membrane immunofluorescence in human malignant melanoma. *Int. J. Cancer* 10: 105-111, 1972

- (39) **Lewis M.G.**, McCloy E., Blake J.: the significance of humoral antibodies in the localization of human malignant melanoma. *Brit. J. Surg.* 60: 443-446, 1973

- (40) **Lewis M.G.**, Proctor J.W., Thomson D.M.P., Rowden G., Phillips T.M.: Cellular localization of immunoglobulin within human malignant melanomata. *Br. J. Cancer* 33: 260-266, 1976

- (41) **Macher E.**: Immunologische Aspekte beim malignen Melanom. *Arch. dermatol. Forsch.* 244: 234-239, 1972

- (42) **Macher E.**, Sorg C., Seibert E.: Immunologie des malignen Melanoms. *Langenbecks Arch. Chir.* 342: 533-538, 1976

- (43) **Morton D.L.**, Malmgren R.A., Holmes E.C., Ketcham A.S.: Demonstration of antibodies against human malignant melanoma by immunofluorescence. *Surgery* 64: 233-240, 1968

- (44) **Morton D.L.**: Cancer immunology and the surgeon. *Surgery* 67: 396-398, 1970

- (45) **Morton D.L.**, Eilber F.R., Malmgren R.A., Wood W.C.: Immunological factors which influence response to immunotherapy in malignant melanoma. *Surgery* 68: 158-164, 1970
- (46) **Morton D.L.**: Immunological studies with human neoplasms. *J. of Reticuloendothelial Society* 10: 137-160, 1971
- (47) **Muna N.M.**, Marcus S., Smart C.: Detection by immunofluorescence of antibodies specific for human malignant melanoma cells. *Cancer* 23: 88-93, 1969
- (48) **Nagel G.A.**: Neuere Konzepte in der Behandlung des generalisierten Krebses. *Münch. med. Wschr.* 112: 2339-2349, 1970
- (49) **Nagel G.A.**, Piessens W.F., Stilmant M.M., Lejeune F.: Evidence for tumor-specific immunity in human malignant melanoma. *Europ. J. Cancer* 7: 41-47, 1971
- (50) **Nagel G.A.**, Geiger Ch.: Krebs und Immunität. *Schweiz. med. Wschr.* 101: 1605-1620, 1971
- (51) **Oettgen H.F.**, Aoki T., Old L.J., Boyse E.A., De Harven E., Mills G.M.: Suspension culture of a pigment-producing cell line derived from a human malignant melanoma. *J. Nat. Cancer Inst.* 41: 827-843, 1968
- (52) **Oldham R.K.**, Djeu J.Y., Cannon G.B., Siwarski D., Herberman R.B.: Cellular microcytotoxicity in human tumor systems: Analysis of results. *J. Nat. Cancer Inst.* 55: 1305-1318, 1975

- (53) **Phillips T.M.**, Lewis M.G.: A system of immunofluorescence in the study of tumour cells. Rev. Europ. Etudes Clin. et Biol. 15: 1016-1020, 1970
- (54) **Romsdahl M.M.**, Cox I.S.: Immunofluorescent studies of antibodies against human malignant melanoma. Surg. Forum 10: 126-128, 1969
- (55) **Romsdahl M.M.**, Cox I.S.: Human malignant melanoma antibodies demonstrated by immunofluorescence. Arch. Surg. 100: 491-497, 1970
- (56) **Roth J.A.**, Holmes E.C., Reisfeld R.A., Slocum H.K., Morton D.L.: Isolation of a soluble tumor associated antigen from human melanoma. Cancer 37: 104-110, 1976
- (57) **Schenkein I.**, Bystryn J.-C.: Partial isolation, specificity and immunogenicity of antigens associated with the B16 melanoma. Miami Winter Symposia, Vol. 10, Critical Factors in Cancer Immunology, edited by J. Schultz, R.C. Leif, 1975
- (58) **Schieferstein G.**: Zur Immunologie des malignen Melanoms. Klin. Wschr. 53: 241-253, 1975
- (59) **Sjögren H.O.**, Hellström I., Bansal S.C., Hellström K.E.: Suggestive evidence that the "blocking antibodies" of tumor-bearing individuals may be antigen-antibody complexes. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68: 1372-1375, 1971
- (60) **Storck H.**, Ott F.: Zu Verlauf und Therapie der malignen Melanome. Schweiz. med. Wschr. 106: 1871-1877, 1976

- (61) **Stuhlmiller G.M.**, Seigler H.F.: Characterization of a chimpanzee anti-human melanoma antiserum. Cancer Res. 35: 2132-2137, 1975
- (62) **Sumner W.C.**, Foraker A.G.: Spontaneous regression of human melanoma. Cancer 13: 79-81, 1960
- (63) **Teimourian B.**, McCune W.S.: Surgical management of malignant melanoma. Am. Surgeon 29: 515-519, 1963
- (64) **The T.H.**, Huiges H.A., Schraffordt Koops H., Lamberts H.B., Nieweg H.O.: Surface antigens on cultured malignant melanoma cells as detected by a membrane immunofluorescence method with human sera. Lack of tumor-specific reactions on melanoma lines. Annals New York Acad. of Sc. 254: 528-540, 1975
- (65) **Tritsch H.**: Entwicklungen in der Immuntherapie des malignen Melanoms. Hautarzt 27: 1-7, 1976
- (66) **De Vries J.E.**, Rümke P., Bernheim J.L.: Cytotoxic lymphocytes in melanoma patients. Int. J. Cancer 9: 567-576, 1972
- (67) **De Vries J.E.**, Rümke P.: Immunological studies in melanoma patients treated with BCG. Br. J. Cancer 28: 97-102, 1973
- (68) **Wätzig V.**: Moderne Aspekte der Melanomforschung. I. Klassifizierung, Immunologie. Dermatol. Monatsschr. 163: 353-358, 1977
- (69) **Wätzig V.**: Moderne Aspekte der Melanomforschung. II. Immuntherapie. Dermatol. Monatsschr. 163: 359-366, 1977

- (70) **Whitehouse J.M.A.:** Circulating antibodies in human malignant disease. Br. J. Cancer 28: 170-174, 1973
- (71) **Zaumseil R.-P., Wohlrab W.:** Bemerkungen zur Therapie der malignen Melanome. Dermatol. Monatsschr. 163: 367-371, 1977

LEBENS LAUF

11.09.50	Geburt in Heidelberg als zweite von vier Kindern
1957-1961	Volksschule an der Stuntzstraße, München
1961-1967	Max-Josef-Stift, München
1967-1970	Willi-Graf-Gymnasium, München
1970	Abitur
1970-1977	Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
1978-1979	Medizinalassistentenzeit
20.03.79	Approbation als Ärztin
seit Oktober '79	Medizinische Klinik III Klinikum Großhadern, München

